

BIOPEPTIDOS ENCRIPTADOS DE NUEZ (*Carya illinoensis*) RESISTENTES A ALTAS TEMPERATURAS PARA LA FORMULACIÓN DE UN ALIMENTO FUNCIONAL.

Clara Aguilar Bravo^a, Everardo Mares Mares^a, Mayela Bautista Justo^a, Cristina del Rincón Castro^a, Leandro Gabriel Ordoñez Acevedo^b, Ma. Fabiola León Galván^{a*}.

^a Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos. Carretera Irapuato-Silao km 9.0, El Copal, C.P. 36500. Irapuato, Guanajuato, México.

^b Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. Departamento de Biología Molecular. Camino a la Presa de San José 2055, Lomas 4ta. Sección, 78216. San Luis Potosí, S.L.P. México. * ingfaby@yahoo.com.mx

RESUMEN

Un alimento funcional puede cumplir una función específica mejorando la salud y reduciendo el riesgo de enfermedades. Las proteínas de la dieta tienen propiedades nutricionales, funcionales y biológicas, muchas de las cuales se atribuyen a péptidos bioactivos microencapsulados en los alimentos. Las tendencias actuales están enfocadas a desarrollar tecnologías que mantengan la actividad biológica de éstos péptidos después del procesamiento del alimento y a través de su paso por el tracto digestivo. En este trabajo se eligió como fuente proteica a la nuez, poco estudiada a nivel de proteína, los reportes se enfocan principalmente al estudio de sus ácidos grasos por ser la macromolécula más abundante, sin embargo, es precisamente esta característica la que la convierte en un excelente modelo de estudio por su sistema antioxidante. El objetivo fue obtener el perfil proteómico de nuez sometida a diferentes tratamientos térmicos, con la finalidad de formular un alimento funcional con actividad biológica funcional. Para la obtención de las proteínas de nuez el mejor método fue el de TCA-C para proteína total, y el seriado con diferentes solventes para las proteínas de reserva. El análisis proteómico indicó que existen péptidos microencapsulados que permanecen activos a temperaturas elevadas, con fundamento en lo anterior, se formuló un atole con características funcionales, logrando un producto funcional con 24 % de proteína y un PDCAAS de 100%.

ABSTRACT

A functional food can perform a specific function improving health and reducing the risk of disease. The dietary proteins have nutritional, functional and biological properties, many of which are attributable to microencapsulated bioactive peptides in food. Current trends are focused on developing technologies to maintain the biological activity of these peptides after food processing and through its passage through the digestive tract. This paper was chosen as a protein source to the nut, less studied at the protein level, the reports focus primarily on the study of its fatty acids as the most abundant macromolecule, however, is precisely this characteristic that makes it a excellent model to study the antioxidant system. The objective was to obtain the proteomic profile of walnut subjected to different heat treatments in order to make a functional food with functional biological activity. For obtaining the best nut protein method was TCA- C for total protein, and serial with different solvents for storage proteins. Proteomic analysis indicated that there

microencapsulated remain active peptides at elevated temperatures, based on the above, a gruel made with functional features, achieving a functional product with 24% protein and PDCAAS of 100 %.

Palabras clave: Peptidos microencapsulados, Proteoma, alimento funcional.

Área: Alimentos funcionales.

INTRODUCCIÓN:

La innovación en alimentos funcionales se ha enfocado a la exploración fuentes alternativas de proteínas que sustituyan a las proteínas de origen animal, capaces de suplementar proteína de alta calidad y prevenir la malnutrición. Las proteínas de semillas o vegetales se pueden clasificar de acuerdo a sus funciones biológicas: proteínas de almacenamiento, estructurales y biológicamente activas. Las proteínas de reserva son de particular importancia porque ellas determinan no solo el total del contenido proteínico en la semilla, sino también por su calidad para diversos fines y dictan el requisito de suplementos cuando se utiliza la semilla como alimento para el hombre o los animales domésticos. Las proteínas de reserva según Osborne (1924), se clasifican en las albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Se ha descrito que de forma particular las glutelinas contienen péptidos bioactivos encriptados que pueden tener actividad antihipertensiva, anticarcinogénica, antioxidante entre otras. Pueden ser producidos *in vivo* por la acción de algunas enzimas gastrointestinales, pero también pueden ser sintetizados *in vitro* con la utilización de enzimas específicas. Los alimentos funcionales se definen como aquellos que poseen de manera natural, elementos bioactivos que además del aporte nutrimental, tomadas en dosis superiores a las existentes en esos alimentos tienen un efecto favorable sobre la salud. Cuando la dieta carece de hidratos de carbono o grasas, las proteínas pueden sustituirlos como fuente de energía, en tanto que, lo contrario no sucede, de aquí la importancia de cuidar no solo la cantidad sino la calidad de la proteína.

La principal problemática actual de los alimentos es la insuficiente disponibilidad de alimentos inocuos, variados y nutritivos y el insuficiente acceso a ellos. Lo anterior evidentemente impacta el ámbito económico, social, político, cultural y físico del mundo. Ese sentido, actualmente, la producción de alimentos está enfocada a resolver tanto problemas de deficiencias como de excesos, debido a que nos enfrentamos a una epidemia mundial de obesidad, sin haber resuelto el problema del hambre en muchos países incluyendo a México, las estimaciones más recientes de la FAO (2013).

Por tal motivo este trabajo se enfocó al análisis proteómico de la nuez mediante un fraccionamiento y cuantificación de las proteínas de reserva de nuez sometida a diferentes tratamientos térmicos y tiempos, para la identificación del perfil de péptidos de la nuez con la finalidad de identificar péptidos que resistan el proceso térmico y que puedan ser incorporados en la formulación de un alimento funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Material Biológico

Las muestras de semilla de nuez (*Carya illinoensis*) de variedad Wichita fueron proporcionadas por el INIFAP, Campo experimental Bajío. La nuez fue sometida a diferentes rangos de temperatura: 25°C, 37°C, 55°C, 95°C, y a 120±5°C por diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas). Posteriormente fueron molidas y desengrasadas por el método Soxhlet según lo reportado por el AOAC (1990).

Extracción de Proteína Total por el Método de Tca-C (Ácido Tricloro Acético con 2-Mercaptoetanol).

Se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Savaran y Rose (2004), se mezclaron 0.5g de las muestras de harina de nuez desengrasadas previamente sometidas a diferentes temperaturas y tiempos.

Extracción Seriado de Proteínas.

Para la extracción en serie de las proteínas solubles, se siguió lo propuesto por Osborne (1924) con las modificaciones hechas por Barba de la Rosa et al., (1992).

Las fracciones de proteínas se cuantificaron utilizando el método de Bradford con el kit Protein assay de Biorad en el espectrofotómetro lambda XLS de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Electroforesis Desnaturalizante en Geles de Poliacrilamida: SDS-PAGE.

La electroforesis se realizó de acuerdo con el método reportado por Huerta-Ocampo (2011). Todos los geles se corrieron en un sistema Tetra Mini-Protean de Biorad. La reducción de puentes disulfuro se realizó con β -mercaptoetanol (1% p/v) a 100°C por 5 min. Para la separación de proteínas se emplearon geles de poliacrilamida al 12.5%, en condiciones desnaturalizantes.

Electroforesis en Doble Dimensión 2D.

Para el análisis de primera dimensión (Isoelectroenfoque) se emplearon tiras de 7 cm de un rango de pH de 3 a 10, la rehidratación se realizó por 16 horas y una hora de Isoelectroenfoque en el equipo Protean iEFF 12de Bio-rad. La segunda dimensión se realizó en gel poliacrilamida al 12%.

Formulación y Elaboración de un Alimento Funcional “atole”.

La formulación del atole, se realizó con harina de nuez, soya, Avena y ajonjolí, de acuerdo a los lineamientos propuestos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Organizaciones de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO). Se empleó el método del Puntaje Químico Corregido por la Digestibilidad Verdadera (PDCAAS) (Bautista., 2013).

Digestibilidad Verdadera

Puntaje Químico Corregido por la Digestibilidad Verdadera

Se determinó la determinación de los aminoácidos lisina, triptófano, treonina y aminoácidos azufrados, y consultados los valores de digestibilidad verdadera (obtenidos

de Official Department of Health web site with links to Aids and VIH information from South Africa. 2002) se obtuvo el puntaje químico, que multiplicado por la digestibilidad verdadera proporciono el valor más aproximado de la calidad de proteínas, esto permitió obtener una mezcla con mejor valor respecto a la calidad de proteína porque se complementan sus patrones de aminoácidos.

Comprobación de Peptidos Bioactivos de Nuez en el Producto Final.

Se realizó extracción total y serial del producto previamente liofilizado y desgrasado como se había realizado anteriormente, se corrieron geles de poliacrilamida SDS-PAGE y geles 2D para obtener los péptidos anteriormente encontrados y ver el comportamiento de las proteínas de nuez con las proteínas de ajonjolí, soya y avena.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del Proteóma de Nuez.

Para la proteína total, no se detectó cambio en la calidad de la proteína, se detectan principalmente 75, 63, 53, 37, 28, 25, 22, 19, 15, 13, 8, y 6 KD, no hay reportes con lo que se pueda realizar la comparación .

La presencia de globulinas 7S se detectó principalmente bandas de 75, 37, 25Kda. La fracción de albuminas presenta 4 bandas principales de 6, 8, 52, 55, 60 y 170 kDa; Estos valores corresponden con los reportados por Villanueva y Arnao (2007) en comparación con las albuminas de Amaranto. Las albuminas fueron similares a los de globulinas 11S, Barba de la Rosa et al., (1992).

La fracción globulinas 11S mostró las bandas principales a 60kDa, 50 kDa, 40 kDa, y 29 kDa, 25kDa y 20 kDa. Algunos de estos valores coinciden con lo reportado en la literatura de las proteínas del amaranto (Silva, 2007). La fracción de las prolaminas, solo mostró una banda de aproximadamente de 65kDa. De acuerdo a la clasificación de Rubianes (2007), esta banda pertenece a las ω -gliadinas y el valor más cercano al reportado en comparación con el trigo para las ω -gliadinas en trigo es de 71 KDa.

La fracción glutelinas alcalinas se obtuvieron bandas principales a 20 kDa, 22kDa 25 kDa, 35 kDa, 50 kDa y 80kDa- Con respecto al perfil proteómico analizado por 2D-PAGE, como se observa en la figura 8, para proteína total, no hay pérdida de puntos en el intervalo de 25 a 120°C, solo disminuye el nivel de expresión de los péptidos de menor peso molecular Figura 1.

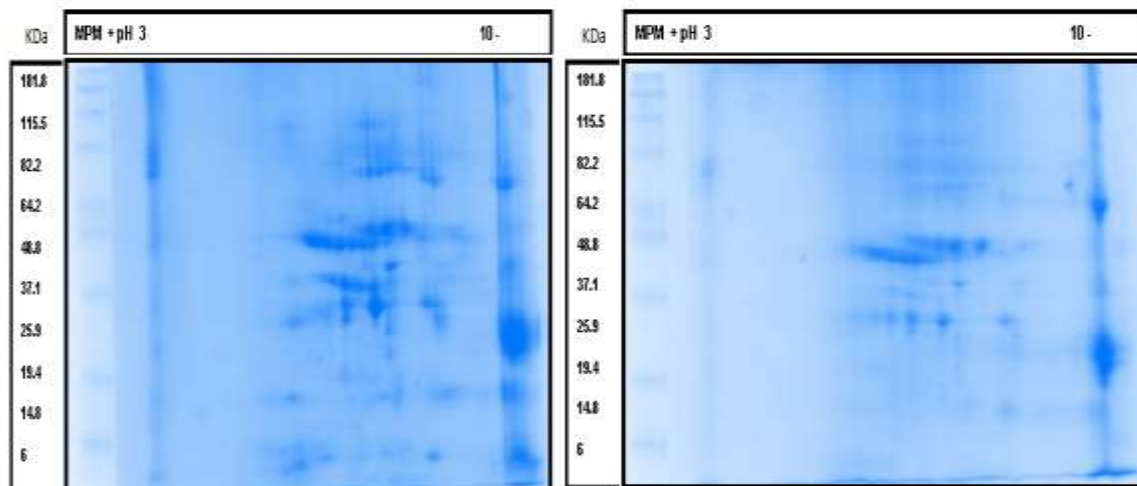


Figura 1. Proteóma de Nuez. a) tratamiento a temperatura ambiente, b) tratamiento a 120 °C

Formulación del alimento funcional.

Para la formulación de un alimento funcional, se plantearon varias opciones, entre ellas: una barra, un derivado de producto lácteo, pero no fueron viables por las temperaturas altas que son requeridas para su producción, de tal forma que se propuso la elaboración de un atole, el cual para su proceso no requiere temperaturas superiores a 105°C.

Para la formulación se empleó nuez, ajonjolí, soya, avena. Fue necesario consultar las tablas de contenido de aminoácidos para cada una de las materias primas (haciendo el cálculo únicamente con los aminoácidos limitantes, tabla 1), al igual que la cantidad de proteína total por cada 100 gramos de alimento (tabla 2).

Tabla 1. Aminoácidos limitantes y contenido de proteína total para cada materia prima.

Aminoácidos limitantes	Nuez	Avena	Soya	Ajonjolí
Lisina	38.5	31.91	63.19	26.11
Cistina+Metionina	12.0	14.44	22.34	26.87
Treonina	38.2	28.51	48.29	34.06
Triptófano	Nd	10.86	11.91	26.20
Proteína Total (gr)	13.43	16.20	47.00	22.40

Tabla 2. Determinación de aminoácido limitante para el atole.

Lisina	3.85	7.97	28.43	5.22	45.47
Cistina+Metionina	1.2	3.61	10.05	5.3	20.16

Treonina	3.82	7.12	21.73	6.81	39.48
Triptófano	Nd	2.71	5.35	5.24	10.3

El análisis sensorial indico que el 73% de los panelistas consideran a este alimento funcional como muy bueno en cuanto al sabor, mientras tanto, solo al 2% le parece mala la textura ya que no le gustan las nueces en trozos y las prefiere molidas con los demás ingredientes. Al 72% les parece muy bueno el color ya que este es natural del propio alimento. En general, el alimentos funcional que consta de avena, soya, ajonjolí y nuez en trozos es aceptado por 70% de los panelistas. La calidad de la proteína del atole formulado fue de 24.15%. La digestibilidad en niños la calidad de la proteínas baja de un 99.96% a un 69%, pero en adultos cubre todas las necesidad de proteína requeridas. Las diferencias de digestibilidad entre las proteínas pueden deberse a diferencias inherentes a la naturaleza de las mismas (configuración, unión de los aminoácidos), a la presencia de componentes no proteicos con influencia en la digestión (fibra dietaría, taninos y fitatos). La digestibilidad verdadera de la nuez es de un 71%, valor relativamente bajo debido a la presencia de taninos hidrolizables (polifenoles) que forman un complejo con las proteínas de la nuez a un pH de 5.5 a 7.2. Para las fracciones proteicas solubilizadas, la digestibilidad corresponde al 100%.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis (15th Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Barba de la Rosa, A. P. 1992. Fractionation procedures, electrophoresis characterization and amino acid composition of amaranth seed protein. Páginas: 931-936.
- Osborne, T.B., 1924. The vetable proteins ed. Longmans. Green New York. Página: 452.
- Padilla Fanny, Guédez Thaneé, Junio 2010. "Fraccionamiento y caracterización de las proteínas solubles de la harina de nuez". Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.
- FAO., 2013. Amino-acid content of foods by Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO). Disponible en: <http://www.fao.org/documents/en/detail/115324>.

Agradecimientos: Los autores agradecen a Ciencia Básica SEP-Conacyt por el apoyo otorgado al proyecto 182549.